

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P99/5378

10.11.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 7月12日

REC'D 06 JAN 2000

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第196938号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant(s):

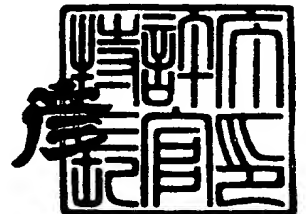
三菱化学株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月17日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3087723

【書類名】 特許願

【整理番号】 J03910

【提出日】 平成11年 7月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 39/39
A61K 47/36

【発明の名称】 細胞性免疫の誘導方法及び細胞性免疫を誘導された細胞

【請求項の数】 11

【発明者】

 【住所又は居所】 三重県津市一身田上津部田 1 5 4 7 - 3 2

 【氏名】 珠玖 洋

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県草津市若草 2 - 1 4 - 1

 【氏名】 砂本 順三

【特許出願人】

 【識別番号】 000005968

 【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100103997

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 長谷川 暁司

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 035035

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9702254

特平 1 1 - 1 9 6 9 3 8

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞性免疫の誘導方法及び細胞性免疫を誘導された細胞

【特許請求の範囲】

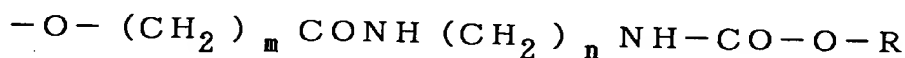
【請求項 1】 疎水化多糖類と抗原との複合体を抗原提示細胞に生体外で反応させることにより細胞性免疫が誘導された細胞。

【請求項 2】 抗原提示細胞が樹状細胞 (dendritic cell) である請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】 疎水化多糖類が、アルキル基またはステロール残基が導入された多糖類であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の細胞。

【請求項 4】 疎水化多糖類が、多糖類を構成する糖単位 100 個あたり 1 ～ 5 個の糖単位の 1 級水酸基が式

【化 1】



(式中、R はアルキル基またはステロール残基を、m は 0 または 1 を、n は任意の正の整数をそれぞれ示す) で表される基を有することを特徴とする多糖類である請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 5】 多糖類が、プルランまたはマンナンであることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 6】 ステロール残基が、コレステロール残基であることを特徴とする請求項 3 又は 4 に記載の細胞。

【請求項 7】 抗原が、MHC クラス I 抗原にオリゴペプチドとして提示され、細胞傷害性 T 細胞を惹起するタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 8】 抗原が、Er b B-2 タンパク質であることを特徴とする請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 9】 抗原が、癌細胞抗原、ウイルス抗原または自己抗原反応性 T 細胞レセプターである請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 10】 疎水化多糖類と抗原との複合体を生体外で抗原提示細胞に反応させることを特徴とする細胞性免疫の誘導化方法。

【請求項 11】 生体内から抗原提示細胞を取り出し、疎水化多糖類と抗原との複合体を抗原提示細胞に反応させた後、再び生体内に戻すことを特徴とする、生体内細胞性免疫の誘導方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞性免疫の誘導方法及び細胞性免疫の誘導された細胞に関する。さらに詳細には、疎水化多糖類と抗原からなる複合体を抗原提示細胞に生体外で反応させることにより、従来のワクチンよりも細胞性免疫、特に抗原に特異的な細胞傷害性T細胞（以下これを「CTL」と略称することがある）が活性化・誘導される。

【0002】

【従来の技術】

CTLは、癌細胞もしくはウイルス感染細胞をそのT細胞レセプターなどを介して特異的に認識して破壊・傷害し、生体内での癌もしくはウイルスに対する生体防御機構として重要であることが知られている。さらに、CTLのT細胞レセプターは癌細胞もしくはウイルス感染細胞の表面に発現されている特異抗原を直接認識するのではなく、マクロファージ、樹状細胞といった抗原提示細胞や癌細胞もしくはウイルス感染細胞それ自身の表面に発現されているMHCクラスI抗原及びそれに結合した特異抗原由来のオリゴペプチド（その特異抗原の「CTLエピトープ」）の複合体を認識することが近年明らかになった。

【0003】

そのようなMHCクラスI抗原／特異抗原由来のオリゴペプチド複合体は以下のようなプロセッシング経路を経て生成され则认为られている。即ち、抗原蛋白質が細胞質内で合成された後、一部は細胞内のプロテアーゼ複合体（「プロテアソーム」）によりオリゴペプチドに分解される。その後、さらにその一部（9～10アミノ酸残基）が小胞体膜に存在する輸送タンパク質、TAP（transporter in antigen processing）により細胞質から小胞体膜内に輸送され、その中でMHCクラスI抗原との親和性の高いものが

優先的にMHCクラスI抗原と結合し、細胞表面に現われる。

【0004】

そこで、癌細胞、ウイルス感染細胞または自己抗原反応性リンパ球を排除することによる癌、ウイルス疾患または自己免疫疾患の治療または予防を目的として、人為的にCTLを活性化するためには、特異抗原を発現する癌細胞もしくはウイルス感染細胞それ自身で生体を免疫するか、または特異抗原またはそれ由来のオリゴペプチドを抗原提示細胞の上記のプロセッシング経路に導入してMHCクラスI抗原との複合体として発現させることが必要である。

【0005】

実際には、上記のような「CTL活性化ワクチン」を開発するため、1) 特異抗原タンパク質をコードする遺伝子をウイルスベクターなどを用いて導入する、2) いくつかのCTLEpitopeを含む、ある程度の大きさの特異抗原タンパク質を何らかの方法で細胞質内に導入する、3) CTLEpitopeとなりうる特異抗原由来9～10アミノ酸のオリゴペプチドを直接抗原提示細胞のMHCクラスI抗原に結合させる、といったアプローチが試みられている。

【0006】

このうち、1)の方法はいわゆる遺伝子治療に相当し、一般的にその効果・安全性については未だ評価の定まるところではない。また、3)のアプローチについては動物実験等によって効果が確かめられてはいるものの、ヒトに応用することを考えた場合実際的な問題が生じると考えられる。即ち、患者一人一人の持つMHCクラスI抗原には様々な種類が存在するため、そのような多様性に対応して生じるCTLEpitopeの多様性をカバーする必要がある。つまり、各々のMHCクラスI抗原に対する高親和性オリゴペプチドのアミノ酸配列モチーフを明らかにし、さらに各々のMHCクラスI抗原に対応するカスタム化を医薬品として実現せねばならず、その開発は現実的には極めて困難と想像される。

【0007】

一方、2)のアプローチについてはいくつかの具体的な実施例が知られており、効果・安全性の点で満足でき、かつ様々な患者に対して適用可能なCTL活性化ワクチン開発に結びつく可能性がもっとも高いと考えられる。実際に、特異抗

原タンパク質をポリペプチドのまま生体に投与して特異的CTLを活性化する場合、何らかのアジュバントとの混合物として投与することが多い。例えば、イスコム (ISCUM) (Takahashi et al., Nature, 344, 873-875, 1990)、QS-21 (Newman et al., J. Immunol., 148, 2357-2362, 1992)、マンナン被覆リポソーム (WO 92/4887 公報)、AF (Raychaudhuri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8308-8312, 1992) といったものが知られている。

【0008】

ところで、多糖類-コレステロール誘導体に関しては、リポソームの多糖被覆剤として使用できること (特開昭 61-69801 号公報)、脂肪乳剤被覆剤 (特開昭 63-319046 号公報) として使用できることが知られている。また、前述のようにマンノースを含む多糖類で被覆された癌細胞抗原またはウイルス抗原-リポソーム複合体、すなわち (抗原) タンパク質をリポソーム化または脂肪乳剤化したのち、多糖類-コレステロール誘導体で被覆するものが、CTL 誘導活性を有することも知られている (WO 92/4887 公報参照)。

また、多糖類-コレステロール誘導体と (抗原) タンパク質のみからなる複合体に関しても、さらに有用なワクチンとなりうることが知られている (WO 98/9650 公報参照)。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、より効率的に細胞性免疫を誘導させる方法について鋭意検討した。その結果、天然多糖にアルキル基またはコレステロール基を導入した疎水化多糖類と抗原タンパク質との複合体を、生体外で抗原提示細胞に反応させることで、効率良く細胞性免疫が活性化され生体防御反応をもたらすことを見出し、本発明を完成するに至った。

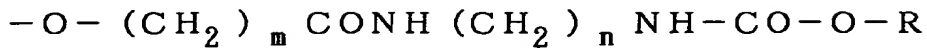
【0010】

すなわち、本発明によれば、疎水化多糖類と抗原との複合体を抗原提示細胞に生体外で反応させることにより細胞性免疫が誘導された細胞；抗原提示細胞が dendritic cell である上記の細胞；疎水化多糖類が、アルキル基またはステロール残基が導入された多糖類であることを特徴とする上記の細胞；

疎水化多糖類が、多糖類を構成する糖単位 100 個あたり 1～5 個の糖単位の 1 級水酸基が式

【0011】

【化 2】



【0012】

(式中、R はアルキル基またはステロール残基を、m は 0 または 1 を、n は任意の正の整数をそれぞれ示す) で表される基を有することを特徴とする多糖類である上記の細胞；多糖類が、プルランまたはマンナンであることを特徴とする上記の細胞；ステロール残基が、コレステロール残基であることを特徴とする上記の細胞；抗原が、MHC クラス I 抗原にオリゴペプチドとして提示され、細胞障害性 T 細胞を惹起するタンパク質であることを特徴とする上記の細胞；抗原が、Er b B-2 タンパク質であることを特徴とする上記の細胞；抗原が、癌細胞抗原、ウイルス抗原または自己抗原反応性 T 細胞レセプターである上記の細胞が提供される。

さらに詳細には、疎水化多糖類と抗原との複合体を生体外で抗原提示細胞に反応させることを特徴とする細胞性免疫の誘導化方法；生体内から抗原提示細胞を取り出し、疎水化多糖類と抗原との複合体を抗原提示細胞に反応させた後、再び生体内に戻す方法が提供される。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳細に説明する。なお、本発明において「アジュバンド」とは、抗原に対する免疫応答を修飾する目的で抗原とともに用いられる物質を意味するものであり、通常は抗体産生や細胞性免疫の強化に用いられるが、場合により免疫応答の負的变化として用いられるものも包含するものである。

【0014】

(1) 抗原

本発明における抗原としては、ポリペプチド、ポリペプチド複合体、グリコプロテイン、核酸等の免疫を惹起する物質を指す。病理学的標的そのものの一部で

あってもよく、または新生物組織またはウイルス感染細胞等の病んだ組織が発現する抗原であってもよい。本発明においては、抗原タンパク質、なかでもMHCクラスI抗原にオリゴペプチドとして提示され、CTLを惹起するタンパク質が用いられる。

【0015】

抗原タンパク質は、そのような抗原決定基を含んでいれば特に起源、純度にこだわるものではない。望ましくは遺伝子組み換え法により作製したものが好適である。抗原タンパク質の分子量は、抗原決定基を含めば特に限定されないが、一般的に500~100,000、好ましくは2,000~100,000である。ペプチド断片としては、アミノ酸数が30個以上のものが好適に用いられる。具体例としては、癌遺伝子産物、ErbB-2 (HER2と略することもある) タンパク質、ras p21 タンパク質、癌抑制遺伝子産物p53 タンパク質、ウイルス由来タンパク質またはT細胞レセプター、例えば自己抗原反応性(自己免疫疾患惹起) T細胞レセプター等の全体ならびにそれらの部分配列を含むタンパク質などが挙げられる。

【0016】

(2) 疎水化多糖類

疎水化多糖類の作製法並びに疎水化多糖類集合体微粒子の作製方法については秋吉らの方法(Akiyoshi et al., *Macromolecules*, 26, 3062-3068 (1993), Akiyoshi et al., *J. Proc. Japan. Acad.*, 71, 71B, 15 (1995)、特開昭61-69801号公報、特開平3-292301号公報、特開平7-97333号公報)を用いることができる。

【0017】

疎水化多糖類における多糖類としては、単糖残基が互いにグリコシド結合してできた高分子をいい、糖類成分は、単糖類、例えば、グルコース、マンノース、ガラクトース、フコース等から、または二糖類またはオリゴ糖類からも誘導できる。糖類単位は1, 2-, 1, 3-, 1, 4-または1, 6-グリコシド結合していてもよい。さらに、 α -または β -型結合のいずれであってもよい。鎖は直鎖上でも枝分かれしていても良い。糖類成分はグルコースであるものが好まし

く、具体的には、天然または合成由来のプルラン、デキストラン、アミロース、アミロペクチン及びマンナンが挙げられ、好ましくはマンナンまたはプルランが用いられる。

【0018】

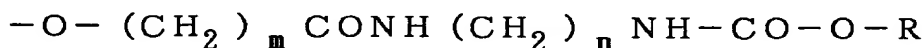
本発明においては、上記のような多糖類に疎水基を導入して疎水化多糖類を作成する。疎水化多糖類としては、特開平 7-97333 号公報に記載のようなりンカーを介して結合しているものであってもよい。

疎水基としては、例えば 1 本鎖及び 2 本鎖のアルキル基またはステロール残基を 100 単糖あたり 1～5 個（重量比で 5%以下）導入したものが望ましいが、特にこれに限定されるわけではなく、封入される抗原の分子量や等電点に応じて封入率のよいものを用いることができる。なお、ステロール残基としては、例えば、コレステロール、スチグマステロール、 β -シトステロール、ラノステロール、エルゴステロール残基などが挙げられるが、好ましくは、コレステロール残基である。また、アルキル基としては、好ましくは炭素数 20 以下、さらに好ましくは炭素数 10～18 であり、直鎖又は分岐鎖のいずれであってもよい。

本発明における疎水化多糖類としては、多糖類を構成する糖単位 100 個あたり 1～5 個の糖単位の 1 級水酸基が式

【0019】

【化 3】



【0020】

（式中、R はアルキル基またはステロール残基を、m は 0 または 1 を、n は任意の正の整数をそれぞれ示す）で表されるものが好ましい。ここで、アルキル基又はステロール残基としては上記したものが挙げられ、n は好ましくは 1～8 である。

（3）疎水化多糖類による抗原の封入方法

疎水化多糖類と抗原との複合体は、疎水化多糖類の集合体微粒子と抗原とを室温で混合した後に、ゲルクロマトグラフ法で処理することにより単離・精製できる（Nishikawa, *Macromolecules*, 27, 7654-7659 (1994)）。

このようにして得られた疎水化多糖類と抗原との複合体はそのまま本発明に用いることができるが、必要に応じて常法に応じて滅菌等の操作を施すことも可能である。

【0021】

(4) 抗原提示細胞

抗原提示細胞とは、生体に侵入した異物の情報をリンパ球に伝えその活動を促す物質のことを指し、これをきっかけにして免疫系が動き出す。例えば、樹状細胞 (dendritic cell)、マクロファージ (貪食細胞)、B細胞、肝臓のクッパー細胞、胸腺上皮細胞などが挙げられる。これらの細胞には主要組織適合抗体 (MHC) クラス I に加えて主要組織適合抗体 (MHC) クラス II が発現されている。

【0022】

樹状細胞を得る方法については、以下の例に限定されないが、例えば動物細胞 (例えばマウス) から骨髓細胞を取り出し、抗体等で調製後骨髓幹細胞群を顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 等の存在下数日間培養することにより得ることができる。また、例えばヒトの末梢血単核球をフィコールコンレイ法等により分離培養し、付着細胞を GM-CSF 及びインターロイキン (IL-4) 等の存在下数日間培養することにより得ることができる。

【0023】

(5) 複合体と抗原提示細胞 (樹状細胞) を反応させる方法

上記 (4) のようにして得られた樹状細胞に、上記 (3) の疎水化多糖類と抗原との複合体の懸濁液を、好ましくは $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ タンパク濃度に加え培養することで反応させることができる。

(6) 細胞性免疫の誘導化

上記複合体が樹状細胞と反応することで、細胞性免疫が誘導されているかについては、樹状細胞と T 細胞群 (例えば CD4 陽性 T 細胞群、CD8 陽性 T 細胞群、ペプチドを認識するように作成された CTL クローン (例えば MHC クラス I に特異的に作用することが知られている HER2 の 63-71 番めのアミノ酸配列を有するペプチドを認識するように作成された HER2 p63-71 という C

TLクローン)等)と混合培養させることで、T細胞群の樹状細胞の殺傷力や刺激・増殖力をラジオアイソトープ等を用いて確認することができる。

【0024】

上記複合体による細胞性免疫の誘導化機構については、上記複合体を樹状細胞に反応させる際、【0003】で述べたようなconventionalなMHCクラスI抗原/抗原オリゴペプチド複合体プロセッシング経路の各ステップを選択的に阻害するような薬剤を同時に処理することにより、該経路を経ていることを確認することができる。

【0025】

即ち、1) 能動的Phagocytosisを阻害するCytochalasin D (例えば $30\mu\text{g}/\text{ml}$)、2) プロテオソーム阻害剤Lactacystin (例えば $100\mu\text{M}$)、3) MHCクラスI抗原の新たな生合成を阻害するCycloheximide (例えば $10\mu\text{g}/\text{ml}$)、4) 蛋白質の小胞体(ER)からゴルジ体への移行を阻害するBrefeldin A (例えば $5\mu\text{g}/\text{ml}$)のような薬剤で樹状細胞を1から3時間前処理、さらに複合体反応時にも同様に処理しておくことにより、上記T細胞群の殺傷能力が無処理群に比べて減弱することから該経路を経ていることを示唆することができる。また、同時に複合体の代わりに直接抗原エピトープとなるオリゴペプチドを樹状細胞と反応させた場合には上記阻害剤の効果が見られないというような対照実験も可能である。

【0026】

さらに、このようなT細胞群の殺傷能力は5) 受動的macropinocytosisを阻害するAmiloride (例えば 0.2mM)及び6) endosome内で蛋白質が分解されてできたオリゴペプチドのMHCクラスII抗原への結合を阻害するChloroquine (例えば $30\mu\text{M}$)処理によっては阻害を受けないことから、上記複合体による細胞性免疫の誘導化機構が、単に上記複合体の蛋白質徐放作用によりconventionalなMHCクラスI抗原/抗原オリゴペプチド複合体プロセッシング経路以外の経路を経ていることによるものではないことを示すことができる。

【0027】

また上記(5)で得られた細胞は、生体内に戻すことにより、生体内での細胞性免疫を誘導することができる。

例えば、細胞性免疫を誘導された樹状細胞はその活性化を維持した状態(例えば通常用いられる緩衝液や血液成分等を含む溶液中)で、生体内(例えば血中や骨髓中)に注射等の方法で戻すことができる。例えば次の3文献(NATURE MEDICINE, 4(3), 328-332 (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 8078-8082 (1995), Cancer Res., 56, 2479-2483 (1996))に記載の方法等により生体内に戻すことができる。

【0028】

本発明に係る細胞性免疫の誘導された細胞は、通常緩衝液(例えばHBSS、PBS等)、生理食塩水、血液成分等を含む溶液と共に非経口投与することができる。投与方法としては、主に非経口投与である注射や点滴等が挙げられるが必ずしもこれらに限定されるものではない。

また、本発明に係る細胞性免疫の誘導された細胞の投与量は、患者の年齢、体重、症状、疾患の重篤度等により変動する為、最終的には臨床医によって決定されるべきものであるが、一般的には患者1人に対して細胞数として約 10^3 個～ 10^{10} 個を数日および/または数週間ごとに1回ないし数回投与する。

【0029】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

(実施例1)

コレステロール化マンナンまたはプルランと癌遺伝子産物ErbB-2タンパク質との複合体の調製

疎水化多糖は秋吉らの方法(Akiyoshi et al., Macromolecules, 26, 3062-3068 (1993))によって合成した。その結果、コレステロール化マンナン(以下、「CHM-55-2.3」と略記する)としては、分子量約55,000のマンナン(シグマ社製)に100単糖当たり約2.3個のコレステロール残基が導入さ

れた。また、コレステロール化プルラン（以下、「CHP-108-0.9」と略記する）としては、分子量約108,000のプルラン（林原生物化学研究所製）に100単糖当たり約0.9個のコレステロール残基が導入された。水溶液中では、1つの集合体当たり平均7分子のコレステロール残基が会合して形成された疎水性ドメインが約7個含まれるものとなった。

【0030】

上記疎水化多糖をDMSOに溶解した後、PBS（pH7.9）に透析し、さらにプローブ型のソニケーター（トミー精工製URP）を用い、40Wで10分間超音波処理した。このものを1.2μm、0.45μm、0.2μmの順でフィルター濾過することによって疎水化多糖微粒子水溶液を得た。各溶液の疎水化多糖濃度をフェノール硫酸法で定量した結果、CHP-108-0.9は9.62mg/ml、CHM-55-2.3は6.97mg/mlであった。

【0031】

一方、癌原遺伝子ヒトErbb-2タンパク質のアミノ酸の1番目から147番目に相当するポリペプチド（Coussens et al., Science, 230, 1132, 1985）のN末端にヒスチジン・ヘキサマーを融合させた組み換えタンパク質を大腸菌を用いて発現させ、抗原タンパク質として用いた。即ち、下記に示すオリゴヌクレオチド・プライマー2本を用いて、ヒトErbb-2タンパク質のアミノ酸の1番目から147番目に相当するポリペプチドをコードする部分を含むcDNAをPCR法にて増幅した。

【0032】

TS1: 5' -GGATCCATATGGCTGGCGGCCT-3'（配列表の配列番号1）

TS2: 5' -CGACTGGATCCTATGTGAGACTTC-3'（配列表の配列番号2）

得られた449bpのDNA断片を制限酵素NdeIおよびBamHIで切断した。さらに発現プラスミドベクターpET15b（Novagen社）を制限酵素NdeIおよびBamHIで切断した。このようにして作製されたpET15b由来の約5.7kbpのNdeI-BamHI断片に上記ヒトerbb-2

cDNAのPCR DNA断片をライゲーション・キット（宝酒造製）を用いて連結し、大腸菌BL21（DE3）（Novagen社）を形質転換した。アンプシリン耐性のクローンを選別した後、添付されたNovagen社マニュアルにしたがって、組み換えタンパク質を精製した。通常1リットルの培地で培養した組み換え体から、およそ20mgの組み換えタンパク質を得た。

【0033】

上記のようにして得た、疎水化多糖水溶液にヒトErbB-2組み換えタンパク質溶液（PBS/6M尿素中にタンパク質2.0mg/mlを含む）を加え、混合することで、無色透明の疎水化多糖と抗原との複合体を含有する水溶液（CHMまたはCHP5mg/ml、ヒトErbB-2組み換えタンパク質0.25mg/ml）を得た。これについてDLS（Dynamic Light Scattering）測定を行った結果、粒径約250nm、 $k_2/k_{12}=0.156$ の複合体微粒子を得たと考えられた。以下、かくして得られたコレステロール化マンナンとErbB-2タンパク質との複合体を「CHM-ErbB2」、コレステロール化プルランとErbB-2タンパク質との複合体を「CHP-ErbB2」と略記する。

【0034】

一方、疎水化多糖が存在しない同一緩衝液を用いた条件では、ヒトErbB-2組み換えタンパク質は全て不溶化し、沈殿として析出した。

免疫実験の陰性対照としては、Carbonic Anhydrase II（シグマ社製、以下「CAB」と略記する）を用いて疎水化多糖とタンパク質との複合体を作製した。以下、コレステロール化マンナンとCABとの複合体を「CHM-CAB」と、コレステロール化プルランとCABとの複合体を「CHP-CAB」と略記する。

【0035】

（実施例2）

コレステロール化プルランと癌遺伝子産物ヒトErbB-2タンパク質との複合体で処理した樹状細胞群のT細胞活性化に対する効果（T細胞増殖刺激活性）

5匹のメスBALB/cマウスに実施例1で調製したCHP-ErbB2の懸

濁液をタンパク質として、1匹あたり $20 \mu\text{g}$ を1週間間隔で2回皮下免疫した。最終免疫から1週間後に免疫細胞より脾臓細胞を取り出しナイロンウールカラムを用いてT細胞を選択的に選り分けた。得られたT細胞群を抗CD4モノクローナル抗体、抗CD8モノクローナル抗体及び補体源としての家兎血清を用い、抗体及び補体にて処置し、CD4陽性T細胞群、CD8陽性T細胞群及びCD4とCD8T細胞の混合群を調整した。

【0036】

一方6匹のメスBALB/cマウスより骨髓細胞を取り出し、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗B細胞抗体及び補体源としての家兎血清を用いて処置し、骨髓幹細胞群を調製した。得られた細胞群をGM-CSF (100 unit per ml) の存在下にて6日間培養を行い、骨髓由来樹状細胞群を調製した。得られた樹状細胞群にCHP-ErbB2の懸濁液またはCHP-CABの懸濁液をタンパク質にて $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度にて加え、3時間混合培養した後に樹状細胞群を洗浄し、さらに18時間培養を続けた。

【0037】

その後、先に述べたCHP-ErbB2の懸濁液にて免疫されたマウスより得られたCD4陽性T細胞群、CD8陽性T細胞群及びその混合細胞群と、マイトマイシンCにて処置した前述の樹状細胞群と混合培養し、72時間後に ^3H チミジンを加えてT細胞群の増殖を観察した。

その結果、図1に見られる如く、CHP-ErbB2の懸濁液により免疫されたCD4陽性T細胞群、CD8陽性T細胞群及びその混合細胞群は、いずれもがCHP-ErbB2により処理された樹状細胞群とのみ反応し細胞増殖を示したが、CHP-CAB懸濁液にて処理された樹状細胞群及び全く未処置の樹状細胞群によるT細胞群の増殖刺激は認められなかった。尚、図中ではErbB2をHER2として表してある。

【0038】

(実施例3)

コレステロール化プルランと癌遺伝子産物ヒトErbB-2タンパク質との複合体の健常人末梢血由来樹状細胞の抗原提示能に対する効果(細胞傷害活性)

HLA-A2402 (HER2 p63-71を認識する) 又はHLA-A0201を有した正常人末梢血単核球をヒコールコンレイ法により分離した。細胞をプラスチックプレート上で2時間培養した後に、浮遊細胞を除去し、付着細胞をGM-CSF (1000 unit per ml) 及びIL-4 (100 unit per ml) 存在下にて10日間培養した。培養後、浮遊細胞を回収し、骨髓由来樹状細胞として使用した。

【0039】

得られた樹状細胞にCHP-ErbB2懸濁液又はCHP-CAB懸濁液を何れもタンパク量100 μ g/mlの最終濁度にて3時間培養した。細胞を2回洗浄後、さらに16時間培養した後にSodium Cr⁵¹ (50 μ l : 100 mCi) にて標識し、細胞傷害性試験を行った。エフェクター細胞としては、HLA-A2402を有した正常人末梢血リンパ球をErbB2 p63-71ペプチドにてパルスした自家樹状細胞で感作して誘導樹立したCD8陽性HLA-A2402拘束性で同ペプチドを認識するCTLクローンを用いた。

【0040】

その結果、図2に示される如く、CTLクローンは、CHP-ErbB2懸濁液にて処理されたHLA-A2402由来の樹状細胞を優位に殺傷したが、同一人由来でCHP-CAB懸濁液で処置された樹状細胞やHLA-A2402を有していない (HLA-A0201を有する) 健常人より調製された樹状細胞をCHP-ErbB2懸濁液で処置したもの及び同樹状細胞をCHP-CAB懸濁液で処置した細胞に対しては傷害活性を示さなかった。

【0041】

(実施例4)

コレステロール化プルランと癌遺伝子産物ヒトErbB-2タンパク質との複合体で処理した健常人末梢血由来樹状細胞のCTLクローン活性化に対する効果 (CTLクローン増殖刺激活性)

HLA-A2402を有した健常人末梢血単核球より前述の如く調整された樹状細胞を、CHP-ErbB2懸濁液、ErbB2タンパク質のみ、CHP-CAB懸濁液、CABタンパク質のみにて各々タンパク質量100 μ g/ml濃度

にて3時間共培養した後に洗浄後、さらに15時間培養を続けた。

これらの樹状細胞およびE r b B 2 p 6 3-7 1 ペプチドにてパルスした同一人由来樹状細胞を刺激細胞とし、先に述べたE r b B 2 p 6 3-7 1 ペプチド特異的C D 8 陽性H L A-A 2 4 0 2 拘束性のC T L クローンに対する刺激能を検討した。

【0042】

その結果、図3に示される如く、C H P-E r b B 2 の懸濁液にて処置された樹状細胞およびE r b B 2 由来p 6 3-7 1 ペプチドをパルスした樹状細胞は、無処理樹状細胞に比して優位にC T L クローンを刺激し、増殖させた。このことよりC H P-E r b B 2 タンパク質は樹状細胞にE r b B 2 タンパク質を取り込ませた後、同タンパク質に由来するp 6 3-7 1 ペプチドを樹状細胞上のH L A-A 2 4 0 2 分子と共に提示するべく機能することが明らかとなった。

【0043】

(実施例5)

コレステロール化プルランと癌遺伝子産物ヒトE r b B-2 タンパク質との複合体で処理した樹状細胞群の制癌効果

骨髓由樹状細胞群は実施例2に述べた方法で調整した。得られた樹状細胞群に実施例1で調整したC H P-E r b B 2 の懸濁液またはC H P-C A B の懸濁液をタンパク質量として75 μ g/mlの濃度で加えて3時間混合培養した後に樹状細胞群を洗浄し、さらに18時間培養した。

1群4匹のメスB A L B/cマウスに、同系のマウス繊維芽肉腫細胞株 (Dele o et al., J. Exp. Med., 146, 720, 1977 参照) に常法により選択マーカーのn e o 遺伝子とヒトE r b B-2 を発現させた組換え細胞C M S 7 H E を皮下に接種した。腫瘍細胞接種後10日目より、先に述べた方法で処理した樹状細胞群 4×10^5 個を1週間間隔で皮下に免疫した。

接種した腫瘍の大きさを経時的に測定したところ、図4に見られるように、C H P-E r b B 2 で処理した樹状細胞群で免疫されたマウスでは、4匹中4匹とも腫瘍の増殖抑制および完全退縮が観察された(図4のD C (C H P-H E R 2))。一方、C H P-C A B で処理した樹状細胞群や無処理の樹状細胞群で免疫

されたマウスでは、腫瘍の増殖抑制効果はほとんど観察されず（図4のDC（CHP-CAB）およびDC）、この免疫操作の生体内での抗原特異性および制癌効果が示唆された。

【0044】

【発明の効果】

本発明の細胞性免疫を誘導された抗原提示細胞は、従来のワクチンよりも効率良く細胞性免疫が誘導されており、細胞治療法としても極めて有用となりうる。

【0045】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> 細胞性免疫の誘導方法及び細胞性免疫を誘導された細胞

<130> J02522

<160> 12

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213>

<400> 1

ggatccatat ggctggcggc ct

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<400> 2

cgactggatc ctatgtgaga cttc

【図面の簡単な説明】

【図1】

マウスから取り出したCD4陽性T細胞群及びCD8陽性T細胞群の増殖を示

す図である。

たて軸は各々CHP-HER2、CHP-CABで処理した、及び無処理のマウス樹状細胞群を示し、よこ軸は ^3H チミジンのとりこみ量を示す。

【図2】

正常人から得られた樹状細胞をCHP-HER2、CHP-CABで処理したときのCTLクローンによる細胞障害活性を示す図である。

たて軸の上2段はHLA-A2402を有する正常人由来の樹状細胞を、下2段はHLA-A0201を有する正常人由来の樹状細胞を各々CHP-HER2、CHP-CABで処理したものを示し、よこ軸はCr 51 遊離試験でのCTLクローンによる細胞傷害活性を示す。

【図3】

正常人から得られた樹状細胞をCHP-HER2、HER2、CHP-CAB、CAB、HER2 p63-71で処理したときのCTLクロンの増殖を示す図である。

たて軸は各々CHP-HER2、HER2、CHP-CAB、CAB、HER2 p63-71（ポジティブコントロール）で処理もしくは無処理の樹状細胞を示し、よこ軸はCTLクローン（HER2 p63-71）の増殖能を示す。

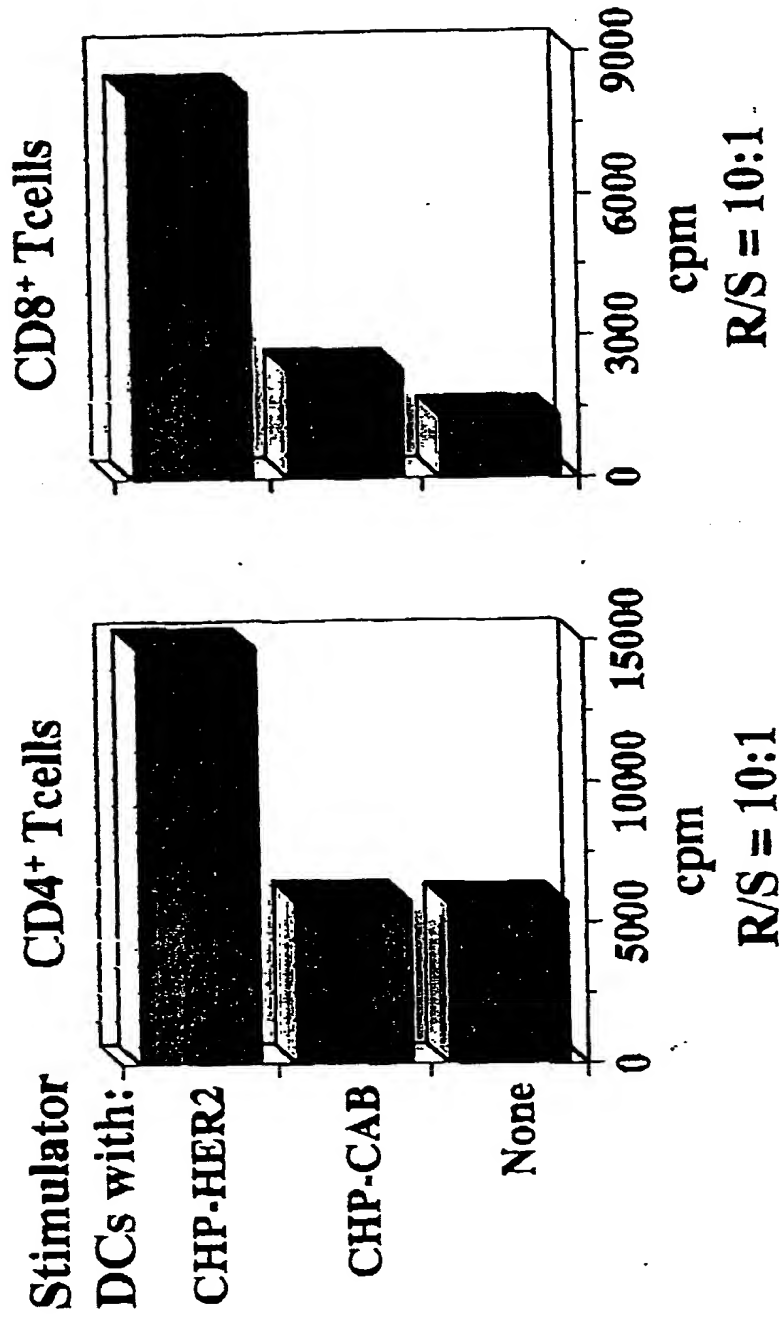
【図4】

ヒトErbbB-2発現マウス腫瘍細胞CMS7HEを接種したマウスに、コレステロール化プルランと癌遺伝子産物ヒトErbbB-2タンパク質との複合体などで処理した樹状細胞群を免疫した場合の、各個体の腫瘍細胞の増殖曲線を示したものである。

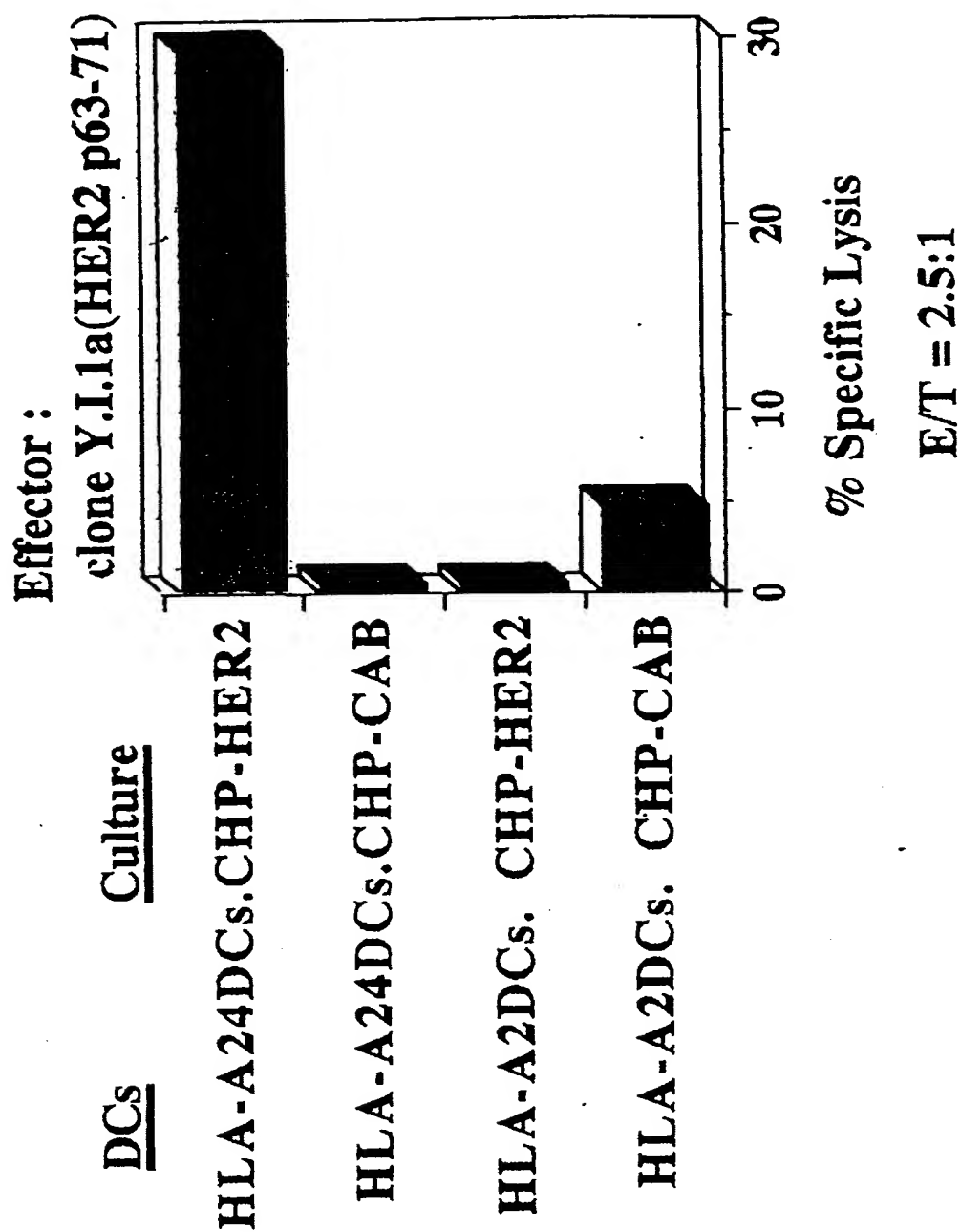
たて軸は腫瘍の長径および短径を測定し、算出した腫瘍サイズ（ mm^2 ）を、よこ軸は腫瘍接種後の日数を示す。図中、DC（CHP-HER2）、DC（CHP-CAB）（対照群）およびDCはそれぞれCHP-ErbbB2、CHP-CAB処理および無処理の樹状細胞群を免疫したマウスのデータを、No treatment は非免疫マウスのデータを示す。

【書類名】 図面

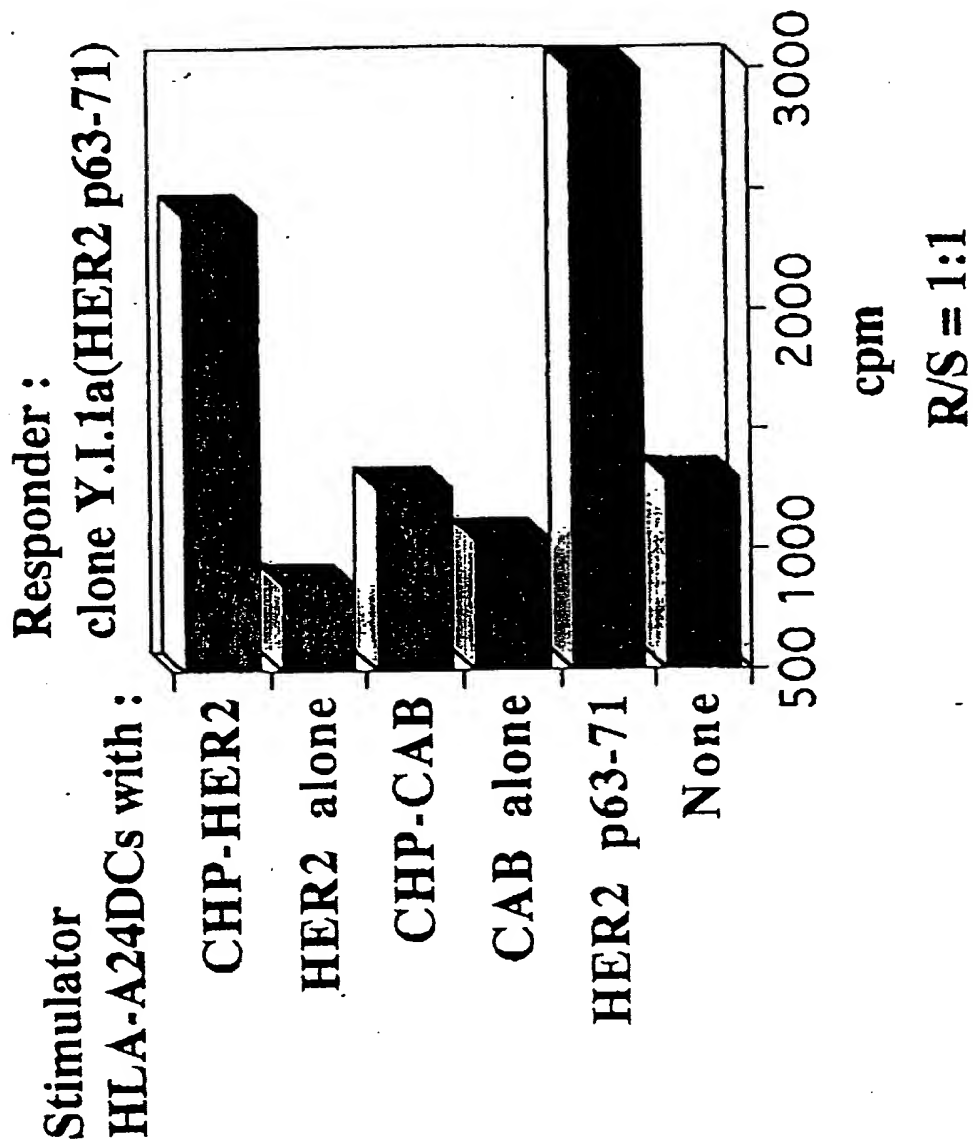
【図 1】



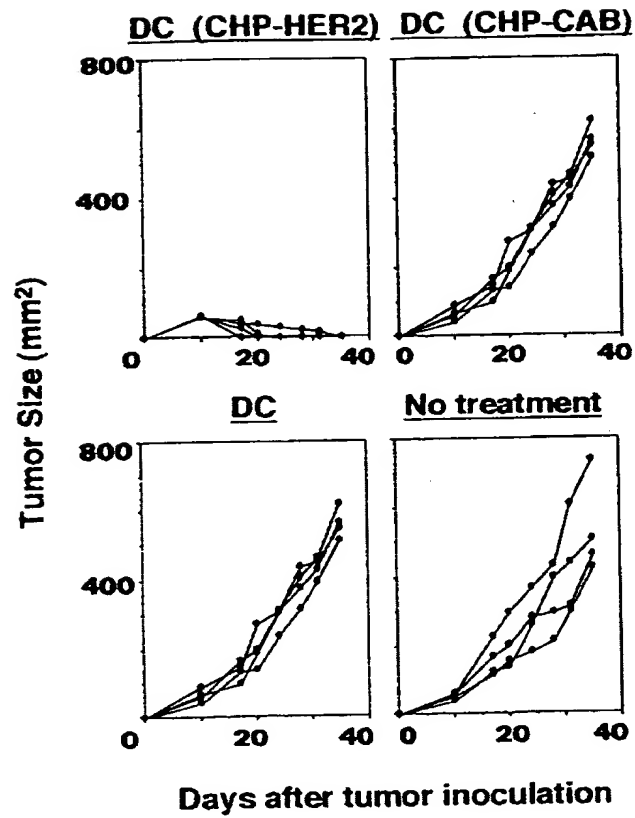
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 より効率的に細胞性免疫を誘導する方法及び細胞性免疫を誘導された細胞を提供する。

【解決手段】 疎水化多糖類と抗原との複合体を抗原提示細胞に生体外で反応させることにより細胞性免疫を誘導する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005968]

1. 変更年月日	1994年10月20日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
氏 名	三菱化学株式会社